



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 43 05 249 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**C 07 H 15/20**  
A 61 K 31/70  
C 12 N 1/14  
C 12 P 15/00  
// C12R 1:80

②① Aktenzeichen: P 43 05 249.5  
②② Anmeldetag: 20. 2. 93  
④③ Offenlegungstag: 25. 8. 94

DE 43 05 249 A 1

⑦① Anmelder:  
Hoechst AG, 65929 Frankfurt, DE

⑦② Erfinder:  
Grabley, Susanne, Dr., 61462 Königstein, DE;  
Thiericke, Ralf, Dr., 65929 Frankfurt, DE; Wink,  
Joachim, Dr., 63322 Rödermark, DE; Hoffmann,  
Dieter, Dr., 35041 Marburg, DE; Zeeck, Axel, Prof.  
Dr., 37075 Göttingen, DE; Wessels, Peter, Dr., 79541  
Lörrach, DE; Henne, Petra, 37075 Göttingen, DE

⑤④ Galaktosylbrefeldin A, ein neuer Metabolit mit pharmakologischer Wirkung, ein Verfahren zu seiner  
Herstellung und seine Verwendung

DE 43 05 249 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft den Naturstoff Galaktosylbrefeldin A, welcher von *Penicillium* sp. während der Fermentation gebildet wird, ein Herstellungsverfahren, gegebenenfalls die chemische Derivatisierung von Galaktosylbrefeldin A, die Verwendung von Galaktosylbrefeldin A als pharmakologischen Wirkstoff und den Mikroorganismus *Penicillium* sp. DSM 7427.

Sekundärmetabolite aus Mikroorganismen werden erfolgreich zur Behandlung von Infektionskrankheiten eingesetzt. Bei Sekundärmetaboliten handelt es sich um niedermolekulare Verbindungen, deren Bildung in "biosynthetischen Einbahnstraßen", die vom Primärmetabolismus abzweigen, erfolgt und deren Funktion für den jeweiligen Produzenten ungeklärt ist. Bis heute sind ca. 8000 aus Kulturen verschiedener Mikroorganismen (vor allem Pilze und Bakterien der Gattung *Streptomyces*) isolierte Sekundärmetabolite bekannt.

Sekundärmetabolite aus Pilzen sind schon seit langer Zeit bekannt und werden im großen Maßstab in verschiedenen Anwendungsgebieten, so z. B. als Cholesterinsenker oder als Anthelminthika benutzt.

Es ist außerdem bekannt, daß Fungi imperfecti, insbesondere *Penicillium cysaneum* und *Alternaria carthami*, unter herkömmlichen Kulturbedingungen Brefeldin A produzieren (Dictionary of Antibiotics and related Compounds, B.W. Bycroft ed., Chapman and Hall, London, p. 182, 1988). Brefeldin A besitzt antifungische Eigenschaften, wurde als Fischtoxin sowie als Weizengerminations-Inhibitor sowie als Protein- und Nucleinsäurebiosynthese-Inhibitor beschrieben.

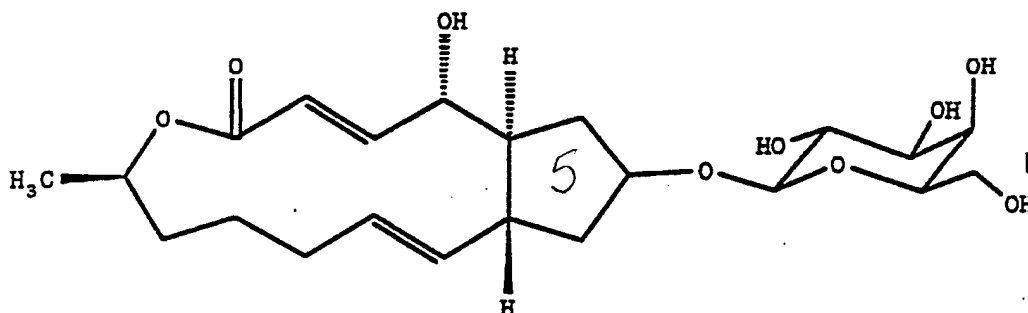
Das Indikationsgebiet mikrobieller Wirkstoffe hat sich zwischenzeitlich auf Krankheiten, die nicht zu den Infektionskrankheiten zählen (z. B. Immunmodulation oder zur Regulation des Fettstoffwechsels) und auf den Pflanzenschutz (Herbizide und Insektizide) ausgeweitet. Die eingesetzten Wirkstoffe sind allerdings oft noch mit Mängeln behaftet, gekennzeichnet durch unbefriedigende Wirkhöhen, eine zu hohe Toxizität und/oder unerwünschte Nebenwirkungen. Daher ist die Motivation vorhanden, nach neuen Wirkmechanismen zu suchen.

Aufgabe der Erfindung ist es, nach mikrobiellen Wirkstoffen mit verbesserten Eigenschaften und neuen Wirkmechanismen zu suchen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch Fermentation von *Penicillium* sp. in einem Nährmedium mit Kohlenstoff- und Stickstoffquelle sowie den üblichen anorganischen Salzen, bis sich Galaktosylbrefeldin A bildet, anschließender Isolierung von Galaktosylbrefeldin A und gegebenenfalls seiner chemischen Derivatisierung. Galaktosylbrefeldin A besitzt pharmakologische und damit therapeutische Wirksamkeit und kann vorteilhaft als Verbindung mit cytostatischen Eigenschaften eingesetzt werden.

Die Erfindung betrifft

#### 1. Verbindung der Formel I



2. Ein Verfahren zur Herstellung der Verbindung der Formel I, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man *Penicillium* sp. in einem Nährmedium kultiviert, bis sich die Verbindung der Formel I in der Kultur anhäuft, die man aus dem Nährmedium isoliert.

3. Eine Verwendung der Verbindung der Formel I als pharmakologisch wirksamen Stoff.

4. *Penicillium* sp. DSM 7427.

Im folgenden wird die Erfindung detailliert beschrieben, insbesondere in ihren bevorzugten Ausführungsformen. Ferner wird die Erfindung durch den Inhalt der Patentansprüche bestimmt.

Die Verbindung der Formel I wird Galaktosylbrefeldin A genannt.

*Penicillium* sp. wird aus einer Erdprobe isoliert. Die Isolierung und Aufreinigung erfolgt nach dem Fachmann bekannten Verfahren durch Kulturverdünnung und Ausplattieren auf dem jeweiligen Selektivagar. Beispielsweise kann man für die Aufreinigung des Pilzes aus der Erde diese unter Herstellung einer Verdünnungsreihe aufschwemmen. Die verschiedenen Verdünnungen (1 : 1 bis 1 : 10.000) werden anschließend auf einen Pilznährboden, z. B. Malzextrakt-Glucoseagar, ausplattiert. Nach einer Bebrütung der Kulturen bei 25°C für die Dauer von 5–10 Tagen entstehen Pilzkolonien, die vereinzelt und durch mehrere, aufeinanderfolgende Aufreinigungsschritte isoliert werden können.

Die Bestimmungen der Pilzgattung *Penicillium* sp. wird anhand von morphologischen und biochemischen Kriterien nach dem Fachmann bekannten Methoden vorgenommen. Die Koloniefarbe ist weiß, die Koniothor sind monoverticillat und die Konidien besitzen eine grün-graue Oberfläche.

Aufgrund von mehreren, aufeinanderfolgenden Isolierungs- und Aufreinigungsschritten wird von *Penicillium* sp. eine Pilzkolonie isoliert, die die Verbindung der Formel I sehr effizient in den Kulturüberstand abgibt und somit als Hauptproduzent bezeichnet wird.

Als Hauptproduzent wird ein Pilzisolat bezeichnet, das die Verbindung der Formel I in einer 10- bis 100-fach erhöhten Menge im Vergleich zu Isolaten der gleichen Pilzart produziert bzw. in den Kulturüberstand abgibt.

Die stark produzierende Pilzkolonie wird vermehrt und ein Isolat von *Penicillium* sp. bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Maschenroder Weg 1B, 3300 Braunschweig, Deutschland, nach den Regeln des Budapestervertrages am 26. Januar 1993 unter der folgenden Nummer hinterlegt: *Penicillium* sp. DSM 7427.

Charakteristisch für *Penicillium* sp. DSM 7427 sind nachfolgende makroskopisch oder per Mikroskop zu analysierende Kriterien: Die Verzweigung der Konidiophoren ist monoverticillat, die Konidien sitzen auf flaschenförmigen Phialiden, sind selbst ellipsoid und besitzen eine raue Oberfläche.

Anstelle des Stammes DSM 7427 können auch dessen Mutanten und Varianten eingesetzt werden, soweit sie die Verbindung der Formel I synthetisieren. Solche Mutanten können in an sich bekannter Weise durch physikalische Mittel, beispielsweise Bestrahlung, wie mit Ultraviolett- oder Röntgenstrahlen oder chemische Mutagene, wie beispielsweise Ethylmethansulfonat (EMS), 2-Hydroxy-4-methoxy-benzophenon (MOB) oder N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) erzeugt werden.

Das Screening nach Mutanten und Varianten, die eine Verbindung der Formel I synthetisieren, erfolgt nach folgendem Schema:

- Abtrennung des Mycels nach der Fermentation;
- Adsorption des Kulturfiltrates an ein Polystyroladsorberharz;
- Elution mit 50%igem Methanol;
- Aufkonzentration und Analytik mittels Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten; als Laufmittel wird ein Chloroform-Methanol-Gemisch (Verhältnis 9 : 1) verwendet;
- Detektion mittels Ansprühen mit einer Mischung aus Anisaldehyd und Schwefelsäure.

Die im folgenden beschriebenen Fermentationsbedingungen gelten für *Penicillium* sp. und das hinterlegte Isolat. Die Fermentation kann im Labormaßstab (Milliliter- und Litermaßstab) oder im industriellen Maßstab (Kubikmetermaßstab) erfolgen.

In einer Nährlösung, die eine Kohlenstoffquelle und eine Stickstoffquelle sowie die üblichen anorganischen Salze enthält, produziert *Penicillium* sp., insbesondere *Penicillium* sp. DSM 7427, die Verbindung der Formel I.

Als bevorzugte Kohlenstoffquellen für die aerobe Fermentation eignen sich assimilierbare Kohlenhydrate und Zuckeralkohole, wie Glukose, Laktose oder D-Mannit sowie kohlenhydrathaltige Naturprodukte, wie z. B. Malzextrakt. Als stickstoffhaltige Nährstoffe kommen in Betracht: Aminosäuren, Peptide und Proteine sowie deren Abbauprodukte, wie Peptone oder Tryptone, ferner Fleischextrakte, gemahlene Samen, beispielsweise von Mais, Weizen, Bohnen, Soja oder der Baumwollpflanze, Destillationsrückstände der Alkoholherstellung, Fleischmehle oder Hefeextrakte, aber auch Ammoniumsalze und Nitrate. An anorganischen Salzen kann die Nährlösung beispielsweise Chloride, Carbonate, Sulfate oder Phosphate der Alkali- oder Erdalkalimetalle, Eisen, Zink, Kobalt und Mangan enthalten.

Die Bildung der Verbindung der Formel I mit *Penicillium* sp., bevorzugt DSM 7427, verläuft besonders gut in einer Nährlösung, die 0,2 bis 7%, bevorzugt 1 bis 5%, Cornsteep, 0,2 bis 7%, bevorzugt 1 bis 5% Lactose sowie 0,1 bis 5%, bevorzugt 0,5 bis 3% Calciumcarbonat enthält, jeweils bezogen auf das Gewicht der gesamten Nährlösung.

Die Kultivierung erfolgt aerob, also beispielsweise submers unter Schütteln oder Rühren oder in Fermentern, gegebenenfalls unter Einführen von Luft oder Wasserstoff. Sie wird in einem Temperaturbereich von 15 bis 30°C, vorzugsweise von 20 bis 30°C, insbesondere von 23 bis 28°C, durchgeführt werden. Der pH-Wert liegt von pH 1 bis 7, vorteilhaft von pH 2,5 bis 4,5. Man kultiviert den Pilz unter diesen Bedingungen über einen Zeitraum von 24 bis 300 Stunden, bevorzugt 36 bis 140 Stunden.

Vorteilhaft kultiviert man in mehreren Stufen, d. h. man stellt zunächst eine oder mehrere Vorkulturen in einem flüssigen Nährmedium her, die dann in das eigentliche Produktionsmedium, die Hauptkultur, beispielsweise im Volumenverhältnis 1 : 10, überimpft werden. Die Vorkultur erhält man z. B., indem man ein versportetes Mycel in eine Nährlösung überimpft und etwa 36 bis 120 Stunden, bevorzugt 48 bis 72 Stunden, wachsen läßt. Das versportete Mycel kann beispielsweise erhalten werden, indem man den Stamm 3 bis 40 Tage, bevorzugt 4 bis 10 Tage, auf einem festen oder flüssigen Nährboden, beispielsweise Hefe-Malz-Agar oder Kartoffel-Dextrose-Agar, wachsen läßt.

Der Fermentationsverlauf kann jeweils anhand des pH-Wertes der Kultur oder des Mycelvolumens sowie durch chromatographische Methoden, wie z. B. Dünnschichtchromatographie oder High Pressure Liquid Chromatography, überwacht werden. Die Verbindung der Formel I ist überwiegend im Kulturfiltrat enthalten.

Die Isolierung der Verbindung der Formel I aus dem jeweiligen Kulturmedium erfolgt nach bekannten Methoden unter Berücksichtigung der chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften der Produkte. Es können z. B. das Adsorptions-, Ionenaustausch- oder Gelfiltrationsverfahren angewendet werden.

Ethylacetat/Methanol/Wasser-Mischungen werden als Laufmittel in dem Fachmann bekannten Konzentrationen, angewandt. Die Detektion bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung kann beispielsweise durch UV-Lösung und Färbereagentien wie Anisaldehyd, Tetrazolblau oder Orcin erfolgen, wobei die Menge der gebildeten Substanz zweckmäßig mit einer Eichlösung verglichen wird.

Zur Isolierung der Verbindung der Formel I werden Kulturbrühe und Mycel der einzelnen Fermentationen zuerst z. B. durch Filtration oder Zentrifugation getrennt. Das Kulturfiltrat wird über ein Adsorberharz, wie z. B.

XAD®-16 Adsorber der Fa. Amberlite gegeben, an dem eine Verbindung der Formel bindet und mit einem Lösungsmittel-Gemisch, z. B. Methanol/Wasser 4 : 1, eluiert wird.

Die Reinsolierung der Verbindung der Formel I erfolgt durch Chromatographie an geeigneten Materialien, vorzugsweise an Kieselgel, Aluminiumoxid, Ionenaustauschern oder Adsorberharzen, durch anschließende Elution mit organischen Lösungsmitteln oder Lösungsmittelgemischen, wie z. B. Essigsäurealkylester, Gemische aus Essigsäurealkylester mit einem niederen Alkanol, Chloroform oder Methylenchlorid bzw. Gemischen dieser Lösungsmittel mit niederen Alkanolen, gegebenenfalls auch mit Wasser, bzw. einem für Ionenaustauscher-Harzen geeigneten pH- bzw. Salzgradienten, wie beispielsweise Kochsalz oder Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl (Tris-Puffer) und Vereinigung der biologisch aktiven Fraktionen. Eine Reinigung ist aber auch durch extraktive Methoden wie flüssig/flüssig-Extraktion oder fest/flüssig-Extraktion möglich.

Die Verbindung der Formel I ist im festen Zustand und in Lösungen im pH-Bereich zwischen pH 3 und 8, insbesondere pH 5 und 7, stabil und läßt sich damit in übliche galenische Zubereitungen einarbeiten.

Die von *Penicillium* sp., bevorzugt *Penicillium* sp. DSM 7427, hergestellten, dann teilsolierte oder isolierte und aufgereinigte Verbindung der Formel I kann für Veresterungsreaktion eingesetzt werden.

Die Veresterungsreaktion wird an den Hydroxygruppen der Verbindung der Formel I durchgeführt.

Die Ester werden nach dem Fachmann bekannten Methoden hergestellt (Organicum, VEB, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1984). Chemisch synthetisiert werden:

Gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder unverzweigte, cyclische oder offenkettige C<sub>1</sub>—C<sub>10</sub>-Alkylester, hydroxy-, amino-, C<sub>1</sub>—C<sub>10</sub>-alkylamino-, oxialkyl-, sulfonyl-, C<sub>1</sub>—C<sub>10</sub>-alkylsulfonyl-, halogen- oder thiosubstituierte aromatische Ester, wobei die Substituenten am aromatischen Ring gleich oder verschieden sein können und der Aromat vorzugsweise ein Benzoyl- oder Aminobenzoylderivat ist. Darüber hinaus kann an den Hydroxygruppen der Verbindung der Formel I eine C<sub>1</sub>-5-Alkylierung nach dem Fachmann bekannten Methoden durchgeführt werden.

Die Verbindung der Formel I eignet sich aufgrund ihrer wertvollen pharmakologischen Eigenschaften zur Anwendung als Arzneimittel.

Die erfindungsgemäße Verbindung besitzt pharmakologische Wirksamkeit, insbesondere als Cytostatikum. Die tumorhemmende Wirkung kann an menschlichen und tierischen Tumorzellen *in vitro* gezeigt werden.

Die Verbindung der Formel I kann grundsätzlich als solche in Substanz verabreicht werden. Bevorzugt ist die Verwendung in Mischung mit geeigneten Hilfsstoffen oder Trägermaterial. Als Trägermaterial können alle pharmakologisch verträglichen Trägermaterialien und/oder Hilfsstoffe verwendet werden.

Die Anwendung betrifft auch pharmazeutische Zubereitungen der Verbindung der Formel I.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel werden im allgemeinen oral oder parenteral verabreicht, aber auch eine rektale Anwendung ist prinzipiell möglich. Geeignete feste oder flüssige galenische Zubereitungsformen sind beispielsweise Granulate, Pulver, Tabletten, Dragees, (Mikro-)Kapseln, Zäpfchen, Sirupe, Emulsionen, Suspensionen, Aerosole, Tropfen oder injizierbare Lösungen in Ampullenform sowie Präparate mit protrahierter Wirkstoff-Freigabe, bei deren Herstellung üblicherweise Trägerstoffe und Zusätze und/oder Hilfsstoffe wie Spreng-, Binde-, Überzugs-, Quellungs-, Gleit- oder Schmiermittel, Geschmacksstoffe, Süßungsmittel oder Lösungsvermittler Verwendung finden. Als häufig verwendete Träger- oder Hilfsstoffe seien z. B. Magnesiumcarbonat, Titanoxid, Laktose, Mannit und andere Zucker, Talkum, Milcheiweiß, Gelatine, Stärke, Vitamine, Cellulose und ihre Derivate, tierische pflanzliche Öle, Polyethylenglykole und Lösungsmittel, wie etwa steriles Wasser, Alkohole, Glycerin und mehrwertige Alkohole genannt.

Gegebenenfalls können die Dosierungseinheiten für die orale Verabreichung mikroverschlossen werden, um die Aufgabe zu verzögern oder über einen längeren Zeitraum auszudehnen, wie beispielsweise durch Überziehen oder Einbetten des Wirkstoffs in Teilchenform in geeignete Polymere, Wachse oder dergleichen.

Vorzugsweise werden die pharmazeutischen Präparate in Dosierungseinheiten hergestellt und verabreicht, wobei jede Einheit als aktiven Bestandteil eine bestimmte Dosis einer Verbindung der Formel I enthält. Bei festen Dosierungseinheiten wie Tabletten, Kapseln und Suppositorien kann diese Dosis bis zu etwa 200 mg, bevorzugt jedoch etwa 0,1 bis 100 mg, und bei Injektionslösungen in Ampullenform bis zu etwa 200 mg, vorzugsweise aber etwa 0,5 bis 100 mg, pro Tag betragen.

Die zu verabreichende Tagesdosis ist abhängig vom Körpergewicht, Alter, Geschlecht und Zustand des Säugers. Unter Umständen können jedoch auch höhere oder niedrigere Tagesdosen angebracht sein. Die Verabreichung der Tagesdosis kann sowohl durch Einmalgabe in Form einer einzelnen Dosierungseinheit oder aber in mehreren kleineren Dosierungseinheiten als auch durch Mehrfachgabe unterteilter Dosen in bestimmten Intervallen erfolgen.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel werden dadurch hergestellt, daß man eine oder mehrere Verbindungen der Formel I mit üblichen Träger- sowie gegebenenfalls Zusatz- und/oder Hilfsstoffe in die bzw. eine geeignete Darreichungsform bringt.

In den sich anschließenden Beispielen wird die Erfindung weiter erläutert. Prozentangaben beziehen sich auf das Gewicht, Mischungsverhältnisse bei Flüssigkeiten beziehen sich auf das Volumen, wenn keine anderen Angaben gemacht wurden.

#### Beispiele

##### 1. a) Herstellung einer Sporensuspension des Produzentenstammes *Penicillium* sp. DSM 7427

100 ml Nährlösung (20 g Malzextrakt, 2 g Hefeextrakt, 10 g Glucose, 0,5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 1 l Leitungswasser, pH-Wert vor der Sterilisation 6,0) in einem 500 ml sterilen Erlenmeyerkolben werden mit dem Stamm DSM 7427 beimpft und 72 Stunden bei 25°C und 140 UpM auf einer rotierenden Schüttelmaschine inkubiert. Anschließend

werden 20 ml Kulturflüssigkeit in einem sterilen 500 ml Erlenmeyerkolben mit dem Nährboden [Kartoffelinfus 4,0 g/l (Infus aus 200 g Kartoffeln in 1000 ml H<sub>2</sub>O), 20,0 g D-Glucose, pH vor der Sterilisation 5,6], dem zusätzlich 15 g Agar/l zur Verfestigung zugegeben wurde, gleichmäßig verteilt und dekantiert. Die Kulturen werden 10 bis 14 Tage bei 25°C inkubiert. Die nach dieser Zeit entstandenen Sporen eines Kolben werden mit 500 ml entionisiertem Wasser, das einen Tropfen eines handelsüblichen nichtionischen Tensids (z. B. <sup>®</sup>Triton X 100, Fa. Serva) enthält, abgeschwemmt, sofort weiterverwendet oder bei -22°C in 50% Glycerin aufbewahrt. 5

#### b) Herstellung einer Kultur bzw. einer Vorkultur des Produzentenstammes im Erlenmeyerkolben

Ein steriler 500 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml der unter a) beschriebenen Nährlösung wird mit einer auf einem Schrägröhrchen gewachsenen Kultur oder mit 0,2 ml Sporensuspension angeimpft und auf einer Schüttelmaschine bei 140 UpM und 25°C inkubiert. Die maximale Produktion einer Verbindung der Formel I ist nach ca. 120 Stunden erreicht. Zum Animpfen von 10- und 100-l Fermentern genügt eine 72 Stunden alte Submerskultur (Animpfmenge ca. 5%) aus der gleichen Nährlösung. 10

#### 2. Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formel I 15

Ein 10-l-Fermenter wird unter folgenden Bedingungen betrieben:

30 g/l	Cornsteep	20
30 g/l	Lactose	
10 g/l	Caliumcarbonat	
pH 6,5	(vor der Sterilisation)	

Der pH-Wert wird mit wäßriger 2 N NaOH oder HCl eingestellt. 25

Inkubationszeit:	120 Stunden	
Inkubationstemperatur:	25°C	
Rührergeschwindigkeit:	200 UpM	30
Belüftung:	5 l Luft/min	

Durch wiederholte Zugabe weniger Tropfen ethanolischer Polyollösung kann die Schaumbildung unterdrückt werden. Das Produktionsmaximum wird nach ca. 96 Stunden erreicht. 35

#### 3. Aufarbeitung

Die Aufarbeitung der Kulturlösung des Stammes *Penicillium* sp. DSM 7427 erfolgt nach folgendem Aufarbeitungsschema: 40

45

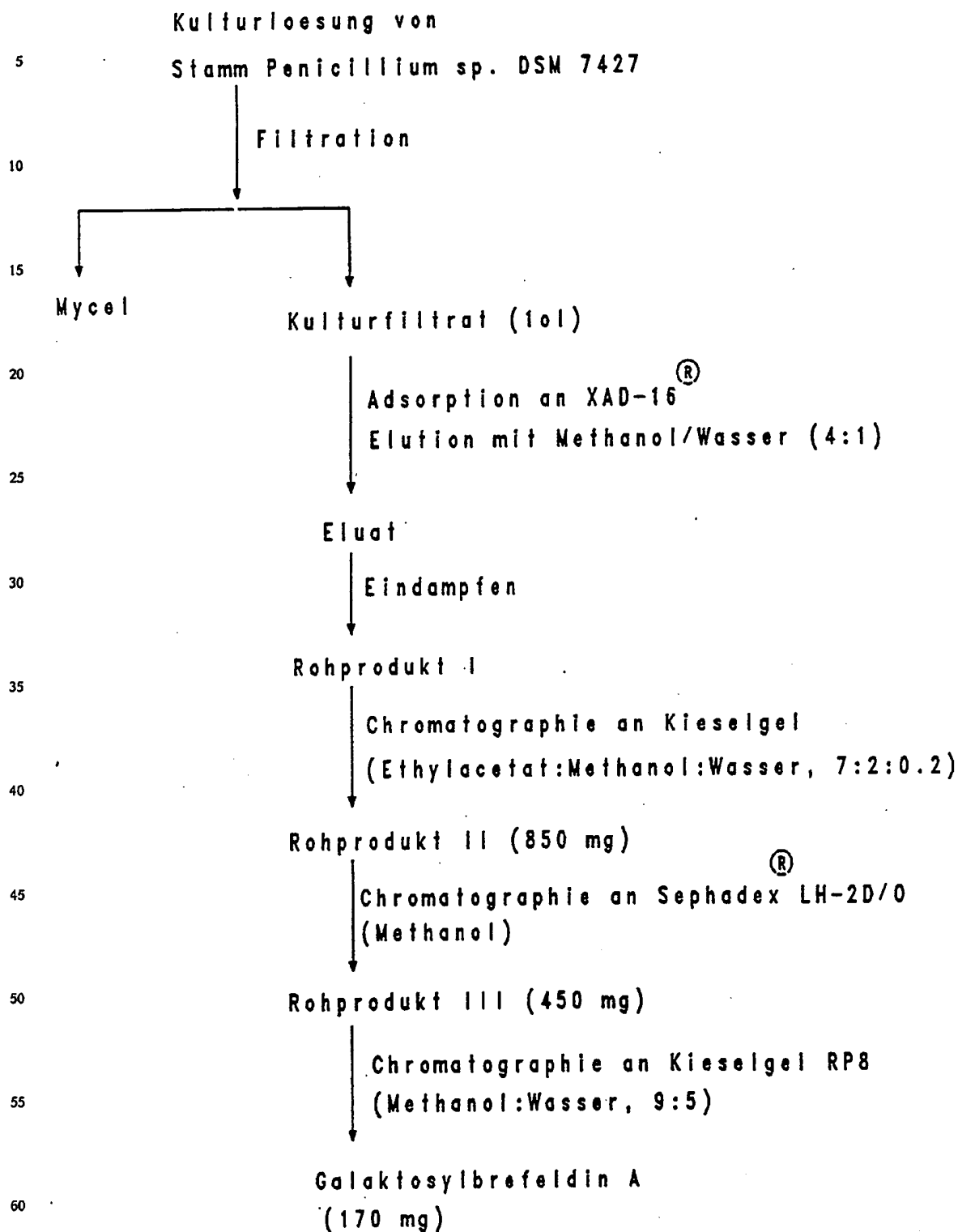
50

55

60

65

## Schema 1: Aufarbeitungsschema:

4. Charakterisierung von  $\beta$ -D-Galaktosylbrefeldin A

65 Molmasse: 442.5 ( $C_{32}H_{34}O_9$ )  
Massenspektroskopie:  
 $\beta$ -D-Galaktosylbrefeldin A-Pentaacetat:

El-MS (70eV) m/e = 652 (0.4%)

Hochauflösung: 652.2731 ( $C_{32}H_{44}O_{14}$ )

$[\alpha]_D^{20} = +22.5$  (c = 0.5 in Methanol)

Schmelzpunkt: 119°C

IR:

(KBr)  $\delta = 3400, 2980, 2940, 2880, 1720, 1645, 1450, 1360, 1260, 1070 \text{ cm}^{-1}$

UV

MeOH  $\lambda_{\text{max}} = 204$  (11630) nm

MeOH (HCl)  $\lambda_{\text{max}} = 203$  (10916) nm

MeOH (NaOH)  $\lambda_{\text{max}} = 214$  (11196) nm.

NMR-spektroskopische Daten

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

	$^{13}\text{C}$ -NMR	$^1\text{H}$ -NMR
C-1	168.3	
C-3	155.1	7.45 (dd, J = 15,5 Hz, J = 3 Hz, 1H)
C-10	138.1	5.30 (dd, J = 15 Hz, J = 9,5 Hz)
C-11	131.2	5.75 (dd, J = 15 Hz, J = 5 Hz)
C-2	117.7	5.82 (dd, J = 15.5, J = 2 Hz)
C-1'	103.6	4.25 (d, J = 2,5 Hz, 1H)
C-7'	80.0	4.26 (m)
C-4	76.6	4.04 (ddd, J = 8 Hz, J = 3Hz, J = 2 Hz)
C-4'	76.5	3,44 (m)
C-2'	75.1	3.44 (m)
C-15	73.1	4.80 (m, 1H)
C-5'	72,5	3.44 (m)
C-3'	70.2	3.84 (dd, J = 2 Hz, J = 0.5 Hz)
C-6'	62.4	3,72 (d, J = 6 Hz, 2 H)
C-5	52.7	1.7 (m)
C-9	45.3	2.37 (m (dt) 1H)
C-8	42.4	2.05 (m) u. 1.50 (m)
C-6	38.8	2.10 (m) u. 1.55 (m)
C-14	35.0	1.6 (m, 2 H)
C-12	32.9	1.9 (m, 2 H)
C-13	28.0	0.90 (m) u. 1.65 (m)
C-16	21.1	1.28 (d, J = 6.2 Hz, 3 H)

65



5. Tumorhemmende Wirkung von  $\beta$ -D-Galaktosylbrefeldin A

## Proliferationstest (MTT-Reduktion)

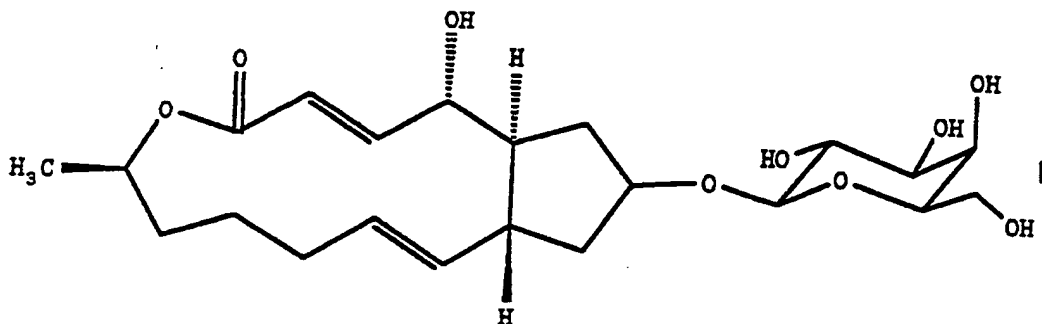
L1210, A549 oder HT29 in exponentieller Wachstumsphase werden in einer Zelldichte von  $5 \times 10^{-3}$  Zellen/ml in RPMI 1640 in einer 96 Well Mikrotiterplatte für 72 Std. mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchte inkubiert. Kontrollexperimente erhalten anstelle der Testsubstanz lediglich Wachstumsmedium. Für jede Testsubstanz sowie für die Kontrolle werden 4fach Bestimmungen angesetzt. Nach 65 Std. Inkubation werden 50  $\mu$ l einer MTT-Lösung (2,5 mg/ml in Phosphat-gepuffertem Kochsalz) zugegeben. In Gegenwart lebender Zellen wird MTT zu einem dunkelroten unlöslichen Formazanfarbstoff reduziert. Diese Reaktion ist nach 7 Std. (L 1210 Zellen) bzw. nach 24 Std. (A 549, HT 29 Zellen) beendet. Das überstehende Medium wird sorgfältig abgesaugt. Der unlösliche Farbstoff wird durch Zugabe von 100  $\mu$ l DMSO aufgelöst und die Extinktion der so entstehenden Lösung anschließend für jede Ansatz in einem Multiscan 340 CC der Fa. Flow bei einer Wellenlänge von 492 nm vermessen.

Für die getestete Verbindung  $\beta$ -D-Galaktosylbrefeldin A ergeben sich folgende Werte:

L-1210	IC <sub>50</sub> 10 $\mu$ g/ml
HT-29	IC <sub>50</sub> 1,3 $\mu$ g/ml
A-549	IC <sub>50</sub> 1,2 $\mu$ g/ml

## Patentansprüche

## 1. Verbindung der Formel



2. Verbindung der Formel I zur Verwendung als Arzneimittel.

3. Arzneimittel, enthaltend Verbindung der Formel I und einen oder mehrere pharmazeutische Träger.

4. Verfahren zur Herstellung der Verbindung der Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß man *Penicillium* sp. in einem Nährmedium kultiviert, bis sich die Verbindung der Formel I in der Kultur anhäuft, die man aus dem Nährmedium isoliert.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man *Penicillium* sp. DSM 7427 in einem Nährmedium kultiviert.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Nährmedium 0,2 bis 7% Cornsteep, 0,2 bis 7% Lactose sowie 0,1 bis 5% Calciumcarbonat enthält, jeweils bezogen auf das Gewicht des gesamten Nährmediums.

7. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Kultivierung von 15 bis 30°C und in dem pH-Bereich von 1 bis 7 erfolgt.

8. Verwendung der Verbindung der Formel I als pharmakologisch wirksamen Stoff.

9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung der Formel I als ein cytostatischer Wirkstoff eingesetzt wird.

10. *Penicillium* sp. DSM 7427 sowie Varianten und Mutanten, soweit diese Varianten und Mutanten die Verbindung der Formel I nach Anspruch 1 herstellen.

- Leerseite -